

2.01.99 - Biologia Geral

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ENSAIO COMETA SOBRE A INTEGRIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.**

Luana Bernardi<sup>1,7\*</sup>, Laynna de Carvalho Schweich<sup>1,7</sup>, Edwin José Torres de Oliveira<sup>2,7</sup>, Adivanio Baranoski<sup>3,7</sup>, Carlos Henrique Marques dos Santos<sup>6</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>4,7</sup>, Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva<sup>5,7</sup>

1. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (PPGSD-UFMS)
2. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas – CCB da Universidade Estadual de Londrina
3. Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (PPGSD-UFMS)
4. Professor Doutor do PPGSD-UFMS
5. Professora Doutora do PPGSD-UFMS/Orientadora
6. Departamento de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Campo Grande, MS, Brasil
7. Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – HUMAP da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**Resumo**

A segurança da expansão *in vitro* de células-tronco mesenquimais é uma preocupação quando esta precede a aplicação clínica. Foram avaliados quatro diferentes protocolos de ensaio cometa para a análise de lesões genômicas em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de humanos, testando os efeitos do tempo de lise e condições de pH da solução tampão de eletroforese: 2 horas e pH=12; 24 horas e pH=12; 2 horas e pH≥13 e 24 horas e pH≥13. Não foram observados danos genômicos nas células; porém, variação no tamanho dos nucleídeos, com aumento no diâmetro da cabeça e comprimento total do cometa destes, ao serem expostas aos protocolos de tempo de lise de 2 horas. A partir dos resultados obtidos, considera-se que qualquer um dos protocolos testados pode ser aplicado em ensaios de genotoxicidade com estas células, sem causar danos decisivos. No entanto, os protocolos 2 e 4 são os mais recomendáveis, por apresentarem menor diâmetro da cabeça do nucleídeo.

**Autorização legal:** nº do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS 3.070.576.

**Palavras-chave:** Dano ao DNA; expressão gênica; reação em cadeia de polimerase.

**Apoio financeiro:** não há apoio financeiro para este estudo.

**Introdução**

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células de origem estromal, que apresentam a capacidade de auto-renovação e de diferenciação multipotente *in vitro*, podendo dar origem a diversos outros tipos celulares (BERNARDO et al., 2012). Estas células estão presentes em diferentes tecidos, no entanto, terapias baseadas em CTM derivadas do tecido adiposo receberam atenção crescente nos últimos anos (DIETZ et al., 2017; MAZUR et al., 2018), devido à sua capacidade de expansão *in vitro*, a qual é necessária para gerar número suficiente de células com fenótipo e funcionalidade desejados (WU et al., 2017). Quanto ao seu uso em tratamentos, a integridade genômica das células em expansão continua sendo uma das principais preocupações quando ela precede a aplicação clínica (NERI et al., 2013).

O ensaio cometa é utilizado para detectar danos no DNA de células em testes de genotoxicidade e biomonitoramento sob várias circunstâncias (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2012). Sob condições alcalinas, ele é capaz de detectar, além de quebras de fita de DNA, lesões que são convertidas nestas quebras, como sítios alcalinos lábeis (ENCISO et al., 2018). Assim, esta técnica é aplicável a vários tipos de células (MOLLER et al., 2018), incluindo as CTM. No entanto, há necessidade de investigar os passos envolvidos na realização deste ensaio (MOLLER et al., 2018), buscando diminuir a influência destes sobre os danos nas células. Assim, o objetivo foi avaliar quatro diferentes protocolos de ensaio cometa para a análise de lesões genômicas em CTM derivadas do tecido adiposo de humanos, testando os efeitos do tempo de lise e condições de pH da solução tampão de eletroforese.

**Metodologia**

**Amostra do estudo**

Três indivíduos saudáveis do sexo feminino, com idade entre 20 e 50 anos, que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), do ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital da Plástica de Mato Grosso do Sul (Campo Grande/MS), participaram deste estudo.

## **Procedimentos de lipoaspiração, processamento do lipoaspirado e cultivo de células-tronco mesenquimais**

O tecido adiposo foi isolado pelo procedimento de lipoaspiração abdominal realizado de acordo com Pesarini et al. (2017).

## **Caracterização por imunofenotipagem e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais**

A imunofenotipagem das células foi caracterizada por citometria de fluxo. Aproximadamente  $3,0 \times 10^5$  CTM na 3ª passagem foram coletadas por tripsinização, centrifugadas e incubadas durante 30 min a 4°C, com anticorpos, para os seguintes marcadores celulares: CD105, CD90, CD34 e CD133 (Pharmingen BD, San Diego, CA. EUA).

Para induzir a diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos,  $10^5$  células/poço foram semeadas em 3 placas (placas de 6 poços). Após a adesão celular (24 horas), o HDMEM foi descartado e, em seguida, as células foram cultivadas com o meio específico, conforme descrito por Schweich et al. (2017).

## **qPCR**

Foram avaliados genes envolvidos em processos referentes a danos e reparos do DNA ( *$\beta$ -Actina*, *ATM*, *ATR*, *GADD45a*, *CDKN1a*, *TP53*), e o ensaio de expressão gênica foi realizado conforme descrito por De Oliveira et al. (2018).

## **Ensaio Cometa**

Para detecção de danos no DNA, utilizou-se o ensaio cometa em quatro protocolos diferentes, em amostras da mesma tripsinização, como segue: (Protocolo 1) Tempo de lise de 2 horas e pH = 12 da solução tampão de eletroforese; (Protocolo 2) Tempo de lise de 24 horas e pH = 12 da solução tampão de eletroforese; (Protocolo 3) Tempo de lise de 2 horas e pH  $\geq$  13 da solução tampão de eletroforese e; (Protocolo 4) Tempo de lise de 24 horas e pH  $\geq$  13 da solução tampão de eletroforese, segundo Tice et al. (2000) e Villela et al. (2007), com modificações (DE OLIVEIRA et al., 2013).

O material foi corado (100  $\mu$ l de brometo de etídio,  $2 \times 10^4$  mg/ml) e os nucleóides foram fotografados em microscópio de fluorescência Leica DMI 8 em magnitude de 200 x, posteriormente foram analisadas mais de 200 cometas por lâmina pelo programa CometScore 2.0.0.38 TriTek. Os cometas foram classificados de acordo com o seu comprimento total (px), diâmetro da cabeça (px), percentagem de DNA na cauda e momento da cauda (percentagem de DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda).

## **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey, onde letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ; GraphPad InStat). A análise estatística dos dados obtidos na qPCR foram analisados utilizando o programa REST, e a diferença significativa considerada quando o nível de expressão relativa foi igual ou inferior a 0,5 ou igual ou superior 2.

## **Resultados e Discussão**

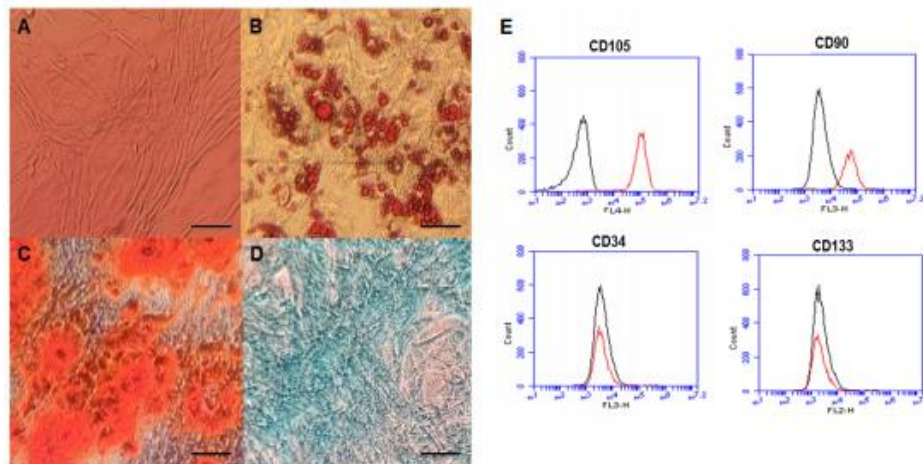
O número médio de células por frasco de cultura observado foi de  $3,0 \times 10^5$ . As células indiferenciadas (controle) e a confirmação da diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica são observadas pelas alterações morfológicas das CTMs (Figura 1). As CTMs expressaram os marcadores CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133. Assim, a análise deste perfil imunofenotípico reconhece que estas são células-tronco mesenquimais (Figura 1E).

Na avaliação de expressão de genes relacionados a danos e reparos de DNA, observamos que os mRNAs destes genes não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Os mRNA dos genes foram expresso, *ATM* em 1,54x, *ATR* em 1,32x, *CDKN1A* em 1,48x, *TP53* em 1,71 e *GADD45A* em 1,97x. Assim, no momento em que as células foram tripsinizadas, estas não apresentavam danos em seu DNA.

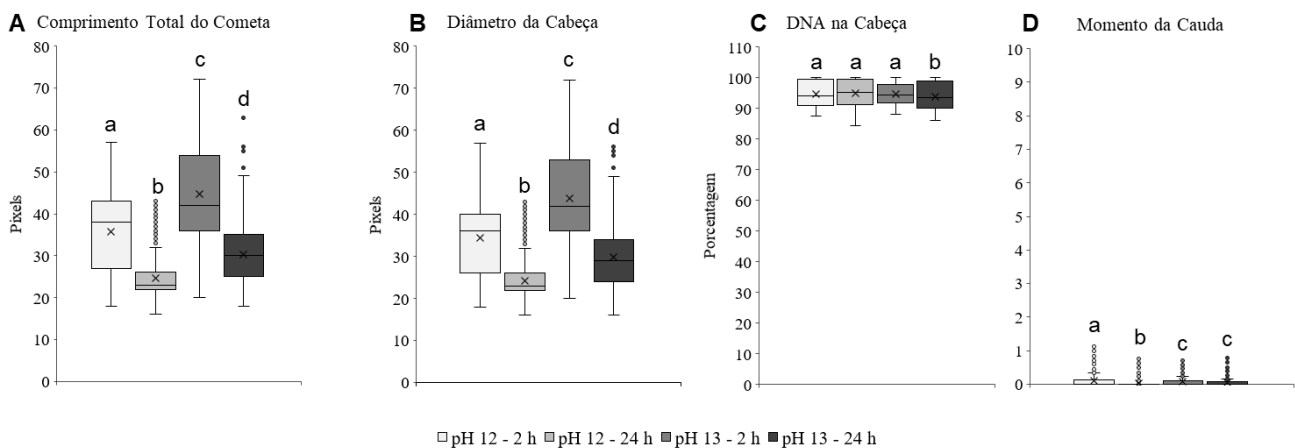
Neste estudo, analisou-se a integridade genômica de CTM humanas do tecido adiposo utilizando o ensaio cometa, a partir da variação de dois fatores que ainda não foram investigados na literatura para estas células. Quatro versões alcalinas foram testadas, sendo duas com pH igual a 12, e duas com pH  $\geq$  13. Enquanto a primeira detecta quebras de fitas duplas e simples do DNA, sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas, a segunda é sensível também à lesões de sítios alcalinos lábeis e sítios abásicos (MIYAMAE et al., 1997; TICE et al., 2000). Já o período gasto com a solução de lise em contato com as células pode variar de uma hora ou até várias horas ou dias (COLINS et al., 2013). Foram observados valores de comprimento do cometa, diâmetro da cabeça dos nucleídeos, percentual de DNA na cabeça e momento da cauda, com diferenças significativas entre os protocolos ( $p < 0,05$ ). Assim, tanto os dois pHs diferentes da solução tampão, quanto os dois tempos de lise, não desempenharam um papel decisivo na ocorrência de danos genômicos nas CTM (Figura 2D). Esta informação pode ser comprovada quando os valores de momento da cauda com CTM de humanos recebem tratamento com irradiação ou sofrem danos induzidos por agentes genotóxicos, como o peróxido de hidrogênio e o metano metilsulfonato (WU et al., 2017).

Por outro lado, observou-se que houve variação no tamanho dos nucleídeos, com aumento no diâmetro da cabeça e aumento no comprimento total do cometa destes, quando as células foram expostas ao tempo de lise de 2 horas em ambos os pHs, sendo que no pH  $\geq$  13 o diâmetro da cabeça e o comprimento total do cometa foram maiores do que no de pH = 12. Estes resultados sugerem que CTM quando expostas a um tempo de lise

menor (2 horas) podem se apresentar mais íntegras quando comparadas à exposição de um tempo de lise maior (24 horas). Assim, nucleoides com menor diâmetro da cabeça evidenciam maior formação de cauda no cometa (LA CRUZ et al., 2008), embora estas não tenham se formado nas células do presente estudo. Este resultado pode ser comparado com outros trabalhos que verificaram cabeça de maior diâmetro em células do grupo controle, comparado ao grupo tratamento, sendo que este último também apresentou caudas mais longas (LA CRUZ et al., 2008; DI PAOLO, 2006). Já em trabalho de Vidya et al. (2014), o diâmetro da cabeça foi maior em células do grupo caso, comparado ao controle, porém sem diferença significativa.



**Figura 1.** Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo: (A) Cultura indiferenciada demonstrando células com características de fibroblastos, (B) cultura de diferenciação adipogênica e vacúolos lipídicos corados com Oil Red O, (C) cultura de diferenciação osteogênica e depósitos de cálcio corados com Vermelho de Alizarina e (D) cultura de diferenciação condrogênica e matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos corada com Alcian Blue. As barras representam 50  $\mu$ m. (E) Perfil imunofenotípico das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. As células expressaram os marcadores CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133.



**Figura 2.** Avaliação da genotoxicidade em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos, usando 4 protocolos de ensaio cometa, obtida pelos dados de comprimento do cometa (2A), diâmetro da cabeça (2B), percentual de DNA na cabeça (2C) e momento da cauda (2D). Protocolo 1: pH 12 da solução tampão de eletroforese e tempo de lise de 2 horas. Protocolo 2: pH 12 da solução tampão de eletroforese e tempo de lise de 24 horas. Protocolo 3: pH 13 da solução tampão de eletroforese e tempo de lise de 2 horas. Protocolo 4: pH 13 da solução tampão de eletroforese e tempo de lise de 24 horas. Médias e desvios-padrão das células danificadas pelo ensaio cometa. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA/Tukey).

## Conclusões

A partir dos resultados obtidos, considera-se que qualquer protocolo testado pode ser aplicado em ensaios de genotoxicidade com CTM de lipoaspirado de humanos, sem causar danos à estas. No entanto, considerando todos os parâmetros analisados e discussão, os Protocolos 2 e 4 são os mais recomendáveis, por apresentarem menor diâmetro da cabeça do nucleoide, sendo mais sensíveis à danos. Porém, recomendamos investigações mais extensas quanto às condições específicas para as diversas etapas do ensaio cometa, com avaliações da interferência de tempos maiores de lise, bem como de outros fatores, a partir de uma avaliação criteriosa dos resultados.

## Referências bibliográficas

- BERNARDO, M. E.; PAGLIARA, D.; LOCATELLI, F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? **Bone Marrow Transplant**, v. 47, n. 2, p. 164-71, 2012.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; HERNÁNDEZ-GARZA, F.; GARCÍA-PÉREZ, J. O.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; AGUADO-BARRERA, M. E.; CERDA-FLORES, R. M. Evaluation of DNA Single and Double Strand Breaks in Women with Cervical Neoplasia Based on Alkaline and Neutral Comet Assay Techniques. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 385245, 2012.
- DIETZ, A. B.; DOZOIS, E. J.; FLETCHER, J. G.; BUTLER, G. W.; RADEL, D.; LIGHTNER, A. L.; et al. Autologous Mesenchymal Stem Cells, Applied in a Bioabsorbable Matrix, for Treatment of Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease'. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 59-62, 2017.
- DE OLIVEIRA, E. J. T.; PESSATTO, L. R.; DE FREITAS, R. O. N.; PELIZARO, B. I.; RABACOW, A. P. M.; VANI, J. M.; et al. New Bis copper complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 356, p. 127-138, 2018.
- DE OLIVEIRA, R. J.; SASSAKI, E. S.; MONREAL, A. C.; MONREAL, M. T.; PESARINI, J. R.; MAURO, M. O.; et al. Pre-treatment with glutamine reduces genetic damage due to cancer treatment with cisplatin. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6040-51, 2013.
- DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio cometa a estudos de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à  $\beta$ -naftoflavona**. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- DE LA CRUZ, F. L.; VALENZUELA-BUSTAMANTE, M.; DUPRÉ, E.; DEL RÍO-PORTILLA, M. A.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. Genomic integrity evaluation in sperm of choromytilus chorus (molina, 1782) by comet assay. **Gayana Concepción**, v. 72, n. 1, p. 36-44, 2008.
- ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A.; CERAIN, A. L. DE; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 25–30, 2018.
- MAZUR, S.; ZOŁOCIŃSKA, A.; SIENNICKA, K.; JANIK-KOSACKA, K.; CHRAPUSTA, A.; POJDA, Z. Safety of adipose-derived cell (stromal vascular fraction - SVF) augmentation for surgical breast reconstruction in cancer patients. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1085-1090, 2018.
- MØLLER P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.
- MIYAMAE, Y.; IWASAKI, K.; KINAE, N.; TSUDA, S.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; SASAKI, Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migrations and alkaline condition. **Mutation Research**, v. 393, p. 107-113, 1997.
- NERI, S.; BOURIN, P.; PEYRAFITTE, J. A.; CATTINI, L.; FACCHINI, A.; MARIANI, E. Human Adipose Stromal Cells (ASC) for the Regeneration of Injured Cartilage Display Genetic Stability after in vitro culture expansion. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 77895, 2013.
- PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; FELICIDADE, I.; NARDI, N. B.; et al. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 861–871, 2017.
- SCHWEICH, L. C.; OLIVEIRA, E. J. T. DE; PESARINI, J. R.; HERMETO, L. C.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B.; et al. All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1267-1274, 2017.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A.; DA SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research**, v. 628, n. 2, p. 76-86, 2007.
- VIDYA, G.; SUMA, H. Y.; VISHNU, B. B.; PARKASH, C.; RAMACHANDRA, R. K.; HARICHANDRAKUMAR, K. T. Estimation of DNA damage through Comet assay in children with Congenital Heart Disease-Case-control study. **Current Pediatric Research**, v. 18, n. 1, p. 1-4, 2014.
- WU, P.; WANG, J.; CHEN, C.; CHAO, K.; MING-CHAU, C.; CHEN, W.; HUNG, S. Early Passage Mesenchymal Stem Cells Display Decreased Radiosensitivity and Increased DNA Repair Activity. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1504–1514, 2017.